

Title	Crystal Structure of the cytoplasmic region of voltage-sensing phosphatase from <i>Ciona intestinalis</i> , Ci-VSP
Author(s)	松田, 真
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59457">https://hdl.handle.net/11094/59457</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	まつ だ まこと 松 田 真
博士の専攻分野の名称	博 士 (理学)
学 位 記 番 号	第 2 4 8 3 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 6 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科高分子科学専攻
学 位 論 文 名	Crystal Structure of the cytoplasmic region of voltage-sensing phosphatase from <i>Ciona intestinalis</i> , Ci-VSP (ホヤ由来電位感受性ホスファターゼ Ci-VSP の細胞質領域の結晶構造解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 中川 敦史 (副査) 教 授 今田 勝巳 教 授 栗栖 源嗣

## 論 文 内 容 の 要 旨

膜電位感受性ホスファターゼ VSP は、膜貫通領域の電位センサー部位と細胞質領域の酵素部位から構成されている。膜貫通領域は電位依存性イオンチャネルの電位センサー領域と、また、細胞質領域はガン抑制タンパク質 PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) とアミノ酸配列の相同性が高い。VSP は脱分極により、細胞膜上に存在するイノシトールリン脂質の PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> や PI (4, 5) P<sub>2</sub> を脱リン酸化する。その活性の強さは膜電位の上昇に伴って増加し、電位依存的に酵素活性を制御する。この電位依存酵素活性のメカニズムは詳細に理解されていないが、膜貫通領域と細胞質領域を結びリンカーが電位依存酵素活性に重要であることが知られている。このような背景のもと、立体構造から機能の解明を目指して、細胞質領域の X 線結晶構造解析とその立体構造に基づいた機能解析を行った。

ホヤ由来 VSP (Ci-VSP) の細胞質領域の発現領域の違う 2 種類の野生型と 365 番目のグリシンをアラニンに変異した G365A 変異体を大腸菌発現系を用いて発現させ、精製、結晶化を行った。それぞれの得られた結晶を用いて、SPRING-8 のビームライン BL44XU にて X 線回折実験を行った。最高分解能 2.0 Å のデータを収集し、これらのデータを用いて結晶構造解析を行った。得られたすべての立体構造はホスファターゼドメインと C2 ドメインから構成されていた。詳細にみると、活性中心の構造が 2 種類の状態であった。それらの構造は活性残基 C363 が近傍の C310 とジスルフィド結合を形成しているものと形成していない 2 状態であった。これらの構造から VSP の活性が酸化、還元により制御されることが考えられた。そこで、還元、酸化状態で PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> と PI (4, 5) P<sub>2</sub> に対する活性測定を行った。還元状態では PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> と PI (4, 5) P<sub>2</sub> に対して脱リン酸化活性を有していたが、酸化状態では脱リン酸化活性は大きく減少していた。このことから、VSP はレドックスにより活性が制御されることが示唆された。さらに、Ci-VSP の細胞質領域のホモログ蛋白質の PTEN との構造比較から活性ポケットを形成している 3 つのループの内の 1 つの TI ループで違いが見られた。Ci-VSP は E411 が活性ポケットの内側を向いているのに対して、PTEN では T167 が外側を向いていた。Ci-VSP の TI ループ上にある E411 に着目し、E411 の各種変異体 (E411A, E411Q, E411T) を作製し、各種のイノシトールリン脂質 (PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub>, PI (3, 4) P<sub>2</sub>, PI (4, 5) P<sub>2</sub>, PI (3, 5) P<sub>2</sub>) に対する活性測定を行った。その結果、E411

は、PI (4, 5) P<sub>2</sub> に対する高い酵素活性や、ほかの基質、とくに PI (3, 5) P<sub>2</sub> に対しての基質特異性について重要な部位であることが判明した。この Ci-VSP の酵素活性のデータと立体構造から VSP と Ins (1, 3, 4, 5) P<sub>4</sub> の複合体モデルを提案した。また、膜に相互作用に重要だと考えられている C2 ドメインにおいて、そのドメインにある CBR3 ループが VSP と PTEN では大きく違っていた。そのループ部分の変異体を作製し、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理実験を行い、CBR3 ループが電位に依存して酵素活性を上昇させるには重要であることを明らかにした。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

膜電位感受性ホスファターゼ VSP は、膜貫通領域の電位センサー部位と細胞質領域の酵素部位から構成される新規膜電位センサー蛋白質である。本蛋白質は、膜貫通領域が電位依存性イオンチャネルの電位センサー領域と、細胞質領域がガン抑制蛋白質 PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10) とアミノ酸配列の相同性が高く、細胞膜内外の電位差に対応して細胞膜上に存在するイノシトールリン脂質の PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> や PI (4, 5) P<sub>2</sub> を脱リン酸化する。その活性の強さは膜電位の上昇に伴って増加し、電位依存的に酵素活性を制御している。本研究では、この電位依存酵素活性のメカニズムを立体構造から明らかにすることを旨として、細胞質領域の X 線結晶構造解析とその立体構造に基づいた機能解析を行った。

構造解析は、ホヤ由来 VSP (Ci-VSP) の細胞質領域の、発現領域の違う 2 種類の野生型と G365A 変異体について行った。Ci-VSP の細胞質領域は、PTEN 同様ホスファターゼドメインと C2 ドメインの 2 つのドメインから構成されていた。構造を詳細に検討したところ、活性残基 C363 が近傍の C310 とジスルフィド結合を形成しているものと形成していないものという酸化還元状態の異なる 2 状態が存在することが明らかになった。さらに、還元、酸化状態での PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> と PI (4, 5) P<sub>2</sub> に対する活性測定を行い、還元状態では PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> と PI (4, 5) P<sub>2</sub> に対して脱リン酸化活性を有しているのに対して、酸化状態では脱リン酸化活性は大きく減少し、VSP が酸化還元状態の違いにより活性が制御されることを示した。また、Ci-VSP の細胞質領域のホモログ蛋白質の PTEN との構造比較から活性ポケットを形成している 3 つのループの内の 1 つの TI ループ上にある E411 に着目し、E411 の各種変異体 (E411A, E411Q, E411T) を作製し、各種のイノシトールリン脂質 (PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub>, PI (3, 4) P<sub>2</sub>, PI (4, 5) P<sub>2</sub>, PI (3, 5) P<sub>2</sub>) に対する活性測定を行った。その結果、E411 が PI (4, 5) P<sub>2</sub> に対する高い酵素活性に重要な残基で、また、他の基質、とくに PI (3, 5) P<sub>2</sub> に対しての基質特異性を決定する重要な部位であることを示した。これらの結果から VSP と Ins (1, 3, 4, 5) P<sub>4</sub> の複合体モデルを提案した。また、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた電気生理実験を行い、VSP に特徴的な構造を有する CBR3 ループが電位に依存して酵素活性を上昇させるのに重要であることを明らかにした。

本研究は、新規膜電位センサー蛋白質 VSP のホスファターゼについて、その原子構造と生化学的・電気生理学的実験に基づく詳細な機能を始めて明らかにした、本分野にとって重要な成果である。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。